

Havupuiden somaattinen alkionkehitys

LuK-tutkielma

Tuuli-Maaret Miettunen

Ekologian ja genetiikan tutkimusyksikkö

Oulun yliopisto

Kesäkuu 2020

Tiivistelmä

Somaattinen alkionkehitys (somatic embryogenesis eli SE) on kasvullisen lisäyksen mikrolisäystekniikoihin kuuluva menetelmä, jonka avulla on mahdollista tuottaa suuri määrä geneettisesti identtisiä taimia. Menetelmässä aloitusmateriaali saadaan hormonikäsittelyn avulla tuottamaan pinnalleen alkioita (jolloin kyseessä on suora SE) tai esialkiollista eli proembryogeenistä PEM-solukkoa, josta alkiot voivat myöhemmin kypsyä (epäsuora SE). Havupuilla SE on epäsuoraa eikä sitä ole mahdollista käynnistää aikuisen yksilön erilaistuneesta solukosta, vaan aloitusmateriaalina on käytettävä kypsyvätöntä siementä ympäröivine solukoineen. Nämä solukot pysyvät menetelmän kannalta parhaimmassa kehitysvaiheessa vain hetken, ja jo siemenen kypsyminen vaikeuttaa tai jopa estää PEM-solukon kehittymisen.

Havupuilla tapahtuva SE voidaan jakaa neljään päävaiheeseen: aloitus-, monistus-, kypsytys- ja idätysvaiheeseen. Eri vaiheisiin siirtymistä ohjataan säätelemällä kasvatusalustojen ravintoaine-, sokeri- ja hormonipitoisuuksia. Aloitusvaiheen alustoilla PEM-solukon kehittyminen saadaan aikaan esimerkiksi auksiinin ja sytokiniinin yhdistelmällä, kun taas monistusvaiheessa alustat sisältävät runsaasti ravinteita ja sokereita solukkojen kasvua varten sekä hormoneja pitämään solukot erilaistumattomina. Monistusvaiheen jälkeen osa PEM-solukosta voidaan varastoida nestetyypeen eli kryopreservoida, jolloin solukon pitäisi olla alkiontuotokkyistä vielä pitkänkin ajan jälkeen. Kryopreservatio mahdollistaisi SE-taimien koeviljelyt ja parhaiden solukkolinjojen valikoinnin laajempaan tuotantoon. Alkioiden kypsyminen käynnistetään ABA-hormonin avulla, minkä jälkeen kypsyneet alkiot siirretään vähäsokerisille ja ravinteisille idätysvaiheen alustoille, jolloin niiden juuret kasvavat. Koska alkiot ovat sopeutuneet suojattuihin solukkoviljelyolosuhteisiin, ne on ennen metsäympäristöön siirtoa sopeutettava kasvamaan kasvihuoneissa multaisilla alustoilla.

Tällä hetkellä havupuiden SE on melko vähän käytetty menetelmä, vaikka sen avulla voitaisiinkin edistää merkittävästi niin metsäpuiden jalostusta, luonnonsuojelua kuin tutkimustakin. Suurin este SE:n kaupalliselle käytölle on menetelmän vaatima käsityön määrä, jonka seurauksena kustannukset taimea kohden ovat huomattavasti korkeammat verrattuna siemenistä lisättyihin taimiin. Korkeiden kulujen lisäksi myös biologiset ongelmat vaikeuttavat menetelmän käyttöä: SE:n laajemman käytön seurauksena voi olla geneettisen monimuotoisuuden väheneminen jos emopuiden määrä jää vähäiseksi tai jos SE:hen huonommin sopeutuvat linjat jäävät jalostuksesta syrjään. Myös alkioiden kloonaukseen kohtaan koetut vahvat ennakkoluulot voivat vaikeuttaa SE:n käyttöä lisäämällä yleistä vastustusta ja vaikuttamalla siten epäsuorasti lainsäädäntöön.

Sisällys

1. Johdanto.....	3
2. Itse prosessi ja siihen vaikuttavat tekijät	4
2.1 Somaattisen alkionkehityksen vaiheet.....	4
2.2 Somaattiseen alkionkehitykseen vaikuttavat geenit ja prosessin epigeneettinen säätely.....	8
2.3 Erot somaattisessa alkionkehityksessä lajien ja genotyyppien välillä	10
2.4 Kryopreservatio ja sen hyödyntäminen somaattisen alkionkehityksen yhteydessä.....	10
3. Soveltaminen käytäntöön	13
3.1 Somaattisen alkionkehityksen hyödyntäminen havupuilla	13
3.2 Ongelmat & riskit.....	15
3.2.1 Biologiset ongelmat.....	15
3.2.2 Sosiaaliset ja taloudelliset ongelmat	16
4. Yhteenveto.....	17
5. Lähteet.....	19

1. Johdanto

Somaattinen alkionkehitys (somatic embryogenesis, SE) on kasvullisen lisäyksen menetelmä, jonka avulla aseptisissa *in vitro*-olosuhteissa somaattiset kasvisolut voidaan ohjelmoida tuottamaan alkioita. Nämä alkiot voidaan edelleen kasvattaa täysikasvuisiksi yksilöiksi. Menetelmän avulla on mahdollista tuottaa suuri määrä alkioita, jotka omaavat saman perimän toistensa ja aloitusmateriaalin kanssa, eli ovat emokasvinsa klooneja (Egertsdotter, 2019; Lelu-Walter ym., 2013). Vanhimpia kasvullisen lisäyksen menetelmiä ovat siementen avulla tapahtuva lisääminen, pistokaslisäys, varttaminen ja juurivesojen avulla tapahtuva monistus, eli niin kutsutut makrolisäystekniikat. SE eli alkionmonistus taas matkii siemenen sisällä tapahtuvaa kasvialkion kehitystä ja kuuluu mikrolisäystekniikoihin.

SE:tä käsitellään tässä tutkielmassa lähinnä ihmisen käyttämänä menetelmänä halutunlaisten kasvien tuottamiseen, mutta pohjimmiltaan se on luonnossa esiintyvä stressireaktio (Méndez-Hernández ym., 2019) ja osoitus kasvisolujen äärimmäisestä totipotentsuudesta eli kyvystä jakautua ja uudelleenerilaistua vielä kypsymisen jälkeenkin (Fehér, 2015). Sen voivat käynnistää esimerkiksi kasvisolukon vaurioituminen sekä ympäristön ääriolosuhteet, kuten huomattavan korkeat tai matalat lämpötilat, maaperän sisältämät raskasmetallit tai kuivuus. Edes ääriolosuhteita ei vaadita, jos koppisiemenisen kasvin emiössä sijaitseva suvullisesti syntynyt alkio menettää kasvukykynsä. Tällöin alkion suspensorin somaattiset solut voivat muuttua embryogeenisiksi ja erilaistua alkioiksi (Méndez-Hernández ym., 2019). Laboratorio-olosuhteissa SE on mahdollista käynnistää altistamalla kasvi tietyille ulkoisesti lisätyille kasvihormoneille (Fehér, 2015). Ensimmäisen kerran somaattisia alkiota tuotettiin tällä tavalla porkkanalla jo 1950-luvulla (Steward ym., 1958).

SE on lupaava esimerkki bioteknologian menetelmistä, joita voitaisiin mahdollisesti hyödyntää jatkuvasti kasvavan puuntarpeen täyttämiseksi (Lelu-Walter ym., 2013). Havupuiden SE:n kehittäminen tehostaisi merkittävästi puiden jalostusta ja tuotantoa, koska sen avulla hyvien vanhempien tuottamasta yhdestä huippulaatuisesta siemenestä olisi periaatteessa mahdollista tuottaa rajaton määrä perimältään identtisiä puita. SE:n avulla tuotetuilla taimilla voitaisiin suorittaa testiviljelyt samalla, kun niiden kanssa geneettisesti identtistä proembryogeenistä massaa säilytettäisiin nestetypessä. Jos testiviljelmien taimet osoittautuisivat hyvälaatuisiksi, varas-toidusta solukosta voitaisiin tuottaa lisää saman perimän omaavia puita. On kuitenkin huomi-

oitava, että saman perimän omaavat taimet omaavat yhteisten vahvuuksiensa lisäksi myös alttiuden samoille stressitekijöille, kuten kasvitaudeille. Tämän vuoksi olisi tärkeää huolehtia siitä, että viljelmissä käytetään useista eri solukkolinjoista kasvatettuja taimia.

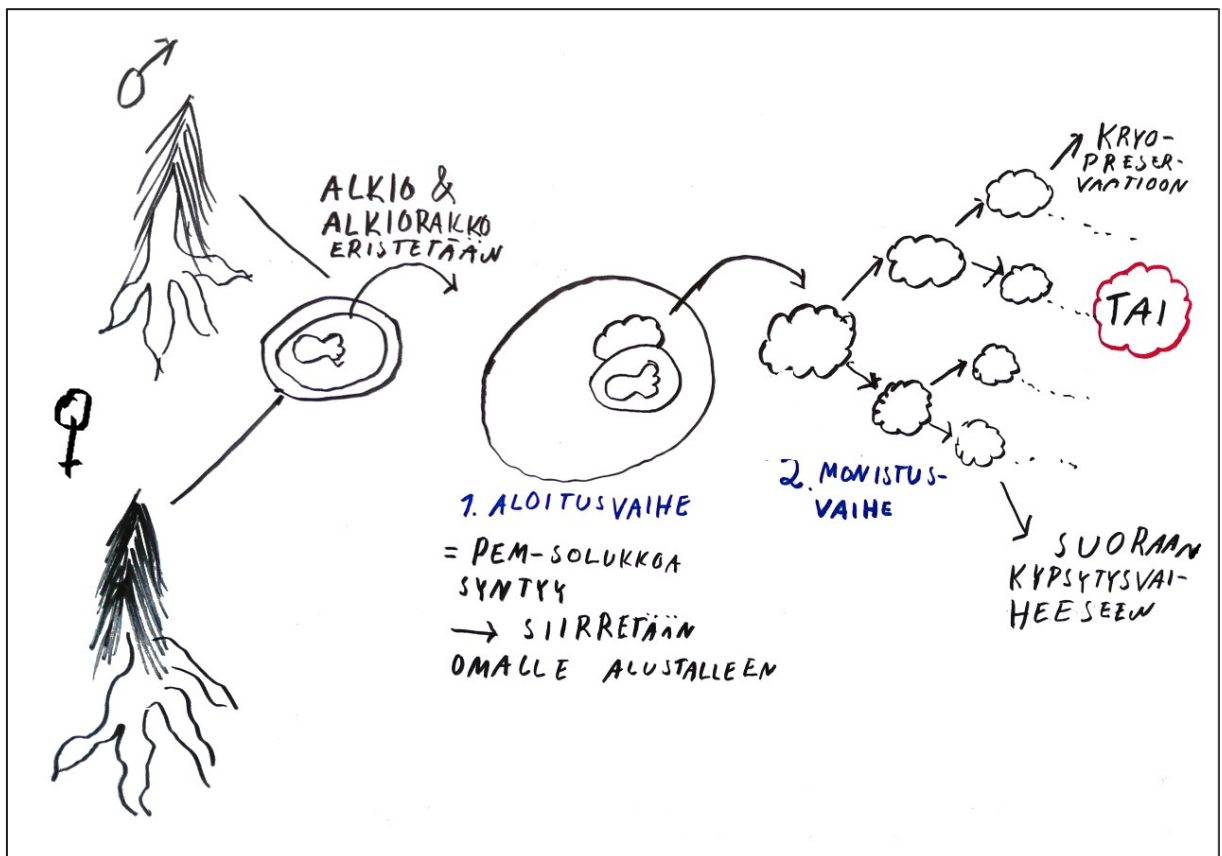
2. Itse prosessi ja siihen vaikuttavat tekijät

2.1 Somaattisen alkionkehityksen vaiheet

Havupuiden SE voidaan jakaa neljään päävaiheeseen: aloitus- (initiation), monistus-/kasvu-, (multiplication, proliferation), kypsytytys- (maturation) ja idätysvaiheeseen (germination). Aloitusvaiheessa lähtömateriaali siirretään yleensä kiinteälle kasvatusalustalle, jonka sisältämät hormonit saavat aikaa proembryogeenisen eli esialkiollisen solumassan (proembryogenic mass, PEM) kehittymisen lähtömateriaalin pinnalle. Syntynyt solumassa siirretään omalle alustalleen ja sen määrää pyritään lisäämään monistusvaiheessa. Havupuiden SE:ssä alkiot kypsyvät tästä PEM-solukosta, joten kyseessä on epäsuora SE. Suorassa SE:ssä alkiot kehittyvät puolestaan suoraan aloitusmateriaalina käytettävän solukon pinnalle, eli PEM:n kaltaista ”välisolukkoa” ei synny (Méndez-Hernández ym., 2019). Kun syntyneen PEM-solukon määrä katsotaan riittäväksi, voidaan solukko siirtää kypsytysvaiheeseen tai säilöä nestetyppeen. Kypsytysvaiheessa esialkiot saadaan kehittymään kypsiksi kasvullisiksi alkioiksi muuttamalla kasvatusalustan sisältämiä hormoneja, jonka jälkeen ne idätetään ja syntyneet sirkkataimet viedään kasvihuoneisiin koulittaviksi.

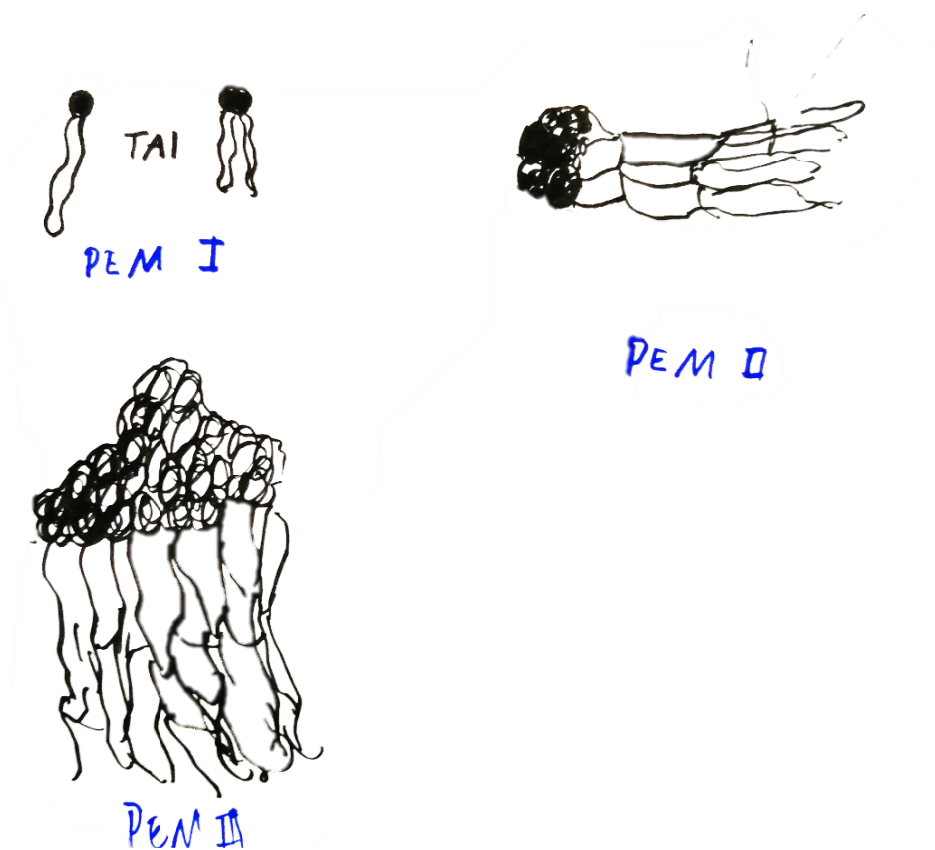
Aloitusmateriaalina käytettävän solukon alkiontuottokykyyn vaikuttavat sen ikä, laji, onko kyseessä erilaistunut vai erilaistumaton solukko, genotyyppi ja kehitysaste sekä koko prosessin aikaiset ympäristötekijät (Méndez-Hernández ym., 2019). Havupuilla lähtömateriaalina on käytettävä suvullisesti syntyneen siemenen kypsyvätöntä alkiota ja sitä ympäröivää megagametofyyttiä eli alkiorakkoa, sillä kypsyneestä alkioista tai jo erilaistuneista solukoista SE onnistuu havupuilla hyvin heikosti tai ei lainkaan (Egertsdotter, 2019). Tämä johtuu siitä, että havupuun solut saavat sekä itseltään että muilta soluilta kypsyamisen myötä yhä enemmän signaaleja, jotka estävät sen jakautumisen uusiksi soluiksi. Tällöin solujen totipotenttisuus heikkenee nopeasti, eikä suurin osa havupuulajeista tästä johtuen kykene lisääntymään suvuttomasti ilman ihmisen apua (Bonga ym., 2010). Kasvatusalusta, jolle alkio asetetaan, sisältää kasvi hormoneja ja ra-

vinteita, kuten typpeä, kivennäisaineita ja vitamiineja sekä sokeria (Varis ym., 2014). Sen sisältämät kasvihormonit saavat aikaan proembryogeenisen massan eli PEM-solukon kehittymisen aloitusmateriaalin pinnalle (kuva 1) (Egertsdotter, 2019). Näin toimivia kasvunsäätelijöitä ovat muun muassa auksiini, sytokiniini ja auksiinin synteettinen vastine 2,4-dikloorifenoksietikkahappo (2,4-D), joka on yleisin SE:n käynnistykseen käytetty hormoni. Se toimii auksiinin tavoin ja saa kasvisolut tuottamaan kasvihormoneja indoli-3-asetyylihappo (IAA) ja abskissihappo (ABA) (Fehér, 2015). Méndez-Hernández ym. (2019) mukaan IAA edesauttaa apikaali-basaaliakselin kehitystä ja ABA puolestaan alkioden syntyä. Yleensä nämä kaksi kasvunsäätelijää voimistavat toistensa vaikutuksia soluissa. Aina näin ei kuitenkaan tapahdu, sillä näiden hormonien väliset toimintamekanismit ovat hyvin monimutkaisia ja ne voivat myös toimia toistensa vaikutuksia heikentäen. Myös ravinteiden, kuten typen ja ammoniakkin määrien suhteilla on merkitystä SE:n aloituksen onnistumisen kannalta (Méndez-Hernández ym., 2019). Aloitusvaiheen lopussa PEM-solukon muodostama massa irrotetaan aloitusmateriaalina käytetystä alkioista ja siirretään monistusvaiheen kasvatusalustalle (Varis ym., 2014).



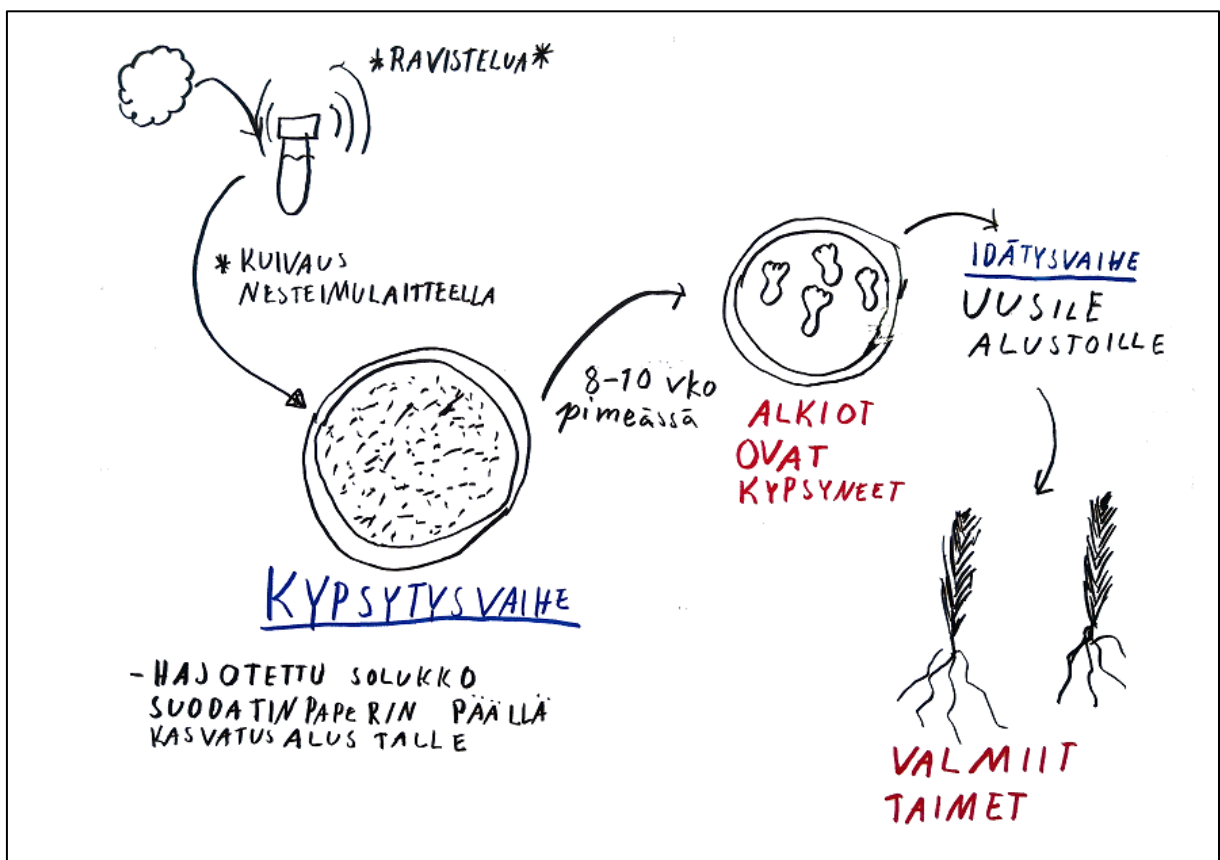
Kuva 1: Aloitus- ja monistusvaiheet

Monistusvaiheessa PEM-solukon määrää pyritään lisäämään, eli solukoiden annetaan rauhassa kasvaa solujen jakaantumisten myötä. Tässä vaiheessa solukot siirretään uusille kasvatusalustoille yleensä 12–14 päivän välein. Näin niillä on käytössään jatkuvasti riittävästi ravinteita ja sokeria ja kasvatusalustoilla tarpeeksi hormoneja pitämään solukot erilaistumattomina. Uusille alustoille siirtämisen yhteydessä solukoita voidaan pieniä ja jakaa useammille kasvatusalustoille (Varis ym., 2014). Filonovan ym. (2000) mukaan PEM-solumassaa on olemassa kolmea eri tyyppiä: PEMI, PEMII ja PEMIII (kuva 2). PEMI-tyypin solumassoissa pieni määrä yhteen puristuneita meristemaattisia soluja on kiinnittynyt vakuolioituneeseen soluun. PEMII:t ovat hiukan ykköstyypin vastineitaan suurempia, sillä vakuolisoituneita soluja on useita, mutta ne ovat kuitenkin kolmostyyppin solumassoja pienempiä ja tiiviimpiä kokonaisuuksia. PEMI:t ja PEMII:t kasvavat ajan myötä suuremmiksi ja muuttuvat lopulta PEMIII:ksi. Kolmostyyppin PEM:eissä on enemmän sekä meristemaattisia että vakuolisoituneita soluja ja ne ovat rakenteeltaan muita PEM-tyyppejä löysempiä ja epäjärjestäytyneempiä.



Kuva 2: Esialkiolliset solukkotyyppit PEMI, PEMII ja PEMIII (Filonovan ym., 2000 mukaan).

Kypsytysvaiheen tarkoituksena on saada PEMIII:t erilaistumaan alkioiksi (Kuva 3). Alkion-
tuoton käynnistämiseksi solukot on siirrettävä kasvatusalustoille, jotka sisältävät ABA-hormo-
nia ja mahdollisesti myös polyetyleeniglykolia (PEG). Tässä vaiheessa ilmenee ero eri PEM-
tyyppien välillä: PEMI- ja PEMII-tyyppien solukot kuolevat ABA:n vaikutuksesta, kun taas
PEMIII:t selviävät ja on mahdollista, että ne alkavat erilaistua alkioiksi (Filonova ym., 2000).
PEG puolestaan kuivattaa solukoita. Solukoita voidaan kuivattaa myös nostamalla kasva-
tusalustojen sokerin määrää tai pienentämällä niiden vesipitoisuutta (Häggman ym., 2005).
Kypsytysvaiheen kasvatusalustat solukoineen siirretään pimeään ja huoneenlämpöiseen tilaan
8–10 viikon ajaksi (Varis ym., 2014), jolloin PEM-solukoiden kasvu loppuu ja PEMIII-solukot
voivat erilaistua alkioiksi.



Kuva 3: Kypsyty- ja idätysvaiheet

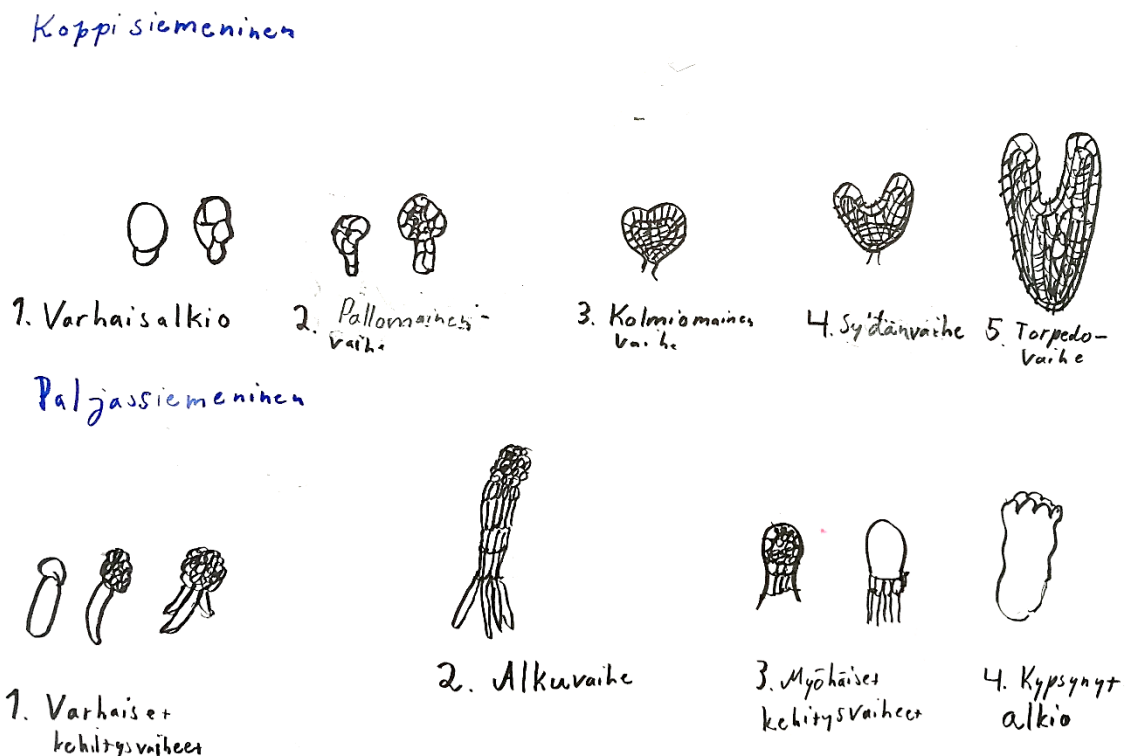
Idätysvaiheessa alkion juuret kasvavat. Tämän vaiheen kasvatusalustoilla on aiempaa vähem-
män ravinteita ja sokeria, jotta alkioit alkaisivat käyttämään alustan ravinteiden sijasta omia ra-
vintovarastojaan (Häggman ym., 2005). Valaistus voi olla idätysvaiheessa jatkuvaa tai osa-ai-
kaista, mutta pimeäjakso ei saisi kestää kahdeksaa tuntia kauempaa ja valon määrän tulisi täl-
löin lisääntyä idätysvaiheen loppua kohden (Varis ym., 2014). Idätyksen jälkeen taimet kouli-
taan eli ne sopeutetaan kasvamaan geelimäisten kasvatusalustojen sijaan maaperässä. Taimet
istutetaan kasvihuoneissa sopivaan materiaaliin, esimerkiksi turpeen ja perliitin seokseen, ja

ilmankosteutta, joka on vaiheen alussa noin 90 %, lasketaan vaiheittain (Varis ym., 2014). Koulumisen jälkeen idätetyt taimet voidaan istuttaa metsäympäristöön (Egertsdotter, 2019).

2.2 Somaattiseen alkionkehitykseen vaikuttavat geenit ja prosessin epigeneettinen säätely

SE:hen vaikuttavista geeneistä mainitaan nyt esimerkkinä neljä, joiden osallisuus prosessiin on käynyt ilmi lukuisissa eri tutkimuksissa. Sekä tsygoottisten eli sukusolujen yhtymisen kautta syntyneiden alkioiden että somaattisten alkioiden kehitykseen osallistuvat geenit vaikuttavat olevan enimmäkseen samoja, vaikkakin somaattisessa alkionkehityksessä stressigeenien on havaittu olevan aktiivisempia (Fehér, 2015).

Somatic embryogenesis receptor kinase (SERK) -geenien on havaittu olevan voimakkaasti aktiivisia koppisiemenisten kasvien somaattisessa alkiossa sen synnystä sydänkehitysvaiheeseen asti (kuva 4) (Méndez-Hernández ym., 2019) ja ylläpitävän solujen erilaistumiskykyä myös havupuilla (Bravo ym., 2017).



Kuva 4: Somaattisen alkion kehitysvaiheet. Mukailtu Smertenkon ja Bozhkovin (2013) artikkelin piirrosta.

WUSCHEL (WUS) -geeniperheen jäsenet puolestaan vaikuttavat version kärkimeristeemin kehitykseen (Méndez-Hernández ym., 2019). Niiden oikeanlainen toiminta lienee välttämätöntä

SE:n onnistumiselle, sillä *WUS*-geenien on havaittu reagoivan solujen auksiinipitoisuuksiin ja ekspressoituvan useilla lajeilla voimakkaasti SE:n aikana (Méndez-Hernández ym., 2019). Paljassiemenisillä ei ole *WUS*-geenejä vaan niiden tapaan toimivia *WUSCHEL-related homeobox gene (WOX)* -geenejä (Smertenko & Bozhkov, 2014). Metsäkuusen (*Picea abies* [L.] H. Karst.) PEM-solukoilla tehdyissä tutkimuksissa havaittiin, että *WOX*-geenit ekspressoituivat vain alkiontuottokykyisissä solukoissa (Bonga ym., 2010). Toisaalta kaikkein voimakkaimmin *WOX*-geenejä ekspressoineet solukot pärjäsivät hyvin kasvuvaiheessa, mutta eivät kyenneet onnistuneeseen alkiontuottoon. *BABY BOOM* -geenin (*BBM*) on havaittu liittyvän solujen määrän lisääntymiseen ja morfogeneesiin eli solukoiden muotoutumiseen (Bravo 2017). *BBM* ekspressoituu alkionkehityksen sydänvaiheessa ja se aktivoi muita SE:hen vaikuttavia geenejä, kuten *LEC1*- ja *LEC2*-geenejä (Méndez-Hernández ym., 2019). *ARGONAUTE (AGO)*-geeniperheen jäsenten on havaittu olevan välttämättömiä kasvialkion normaalille kehitykselle. Metsäkuusen embryogeeniset solukot, joissa erään *AGO*-geenin toiminta oli estetty, eivät tuottaneet joko lainkaan tai vain epämuodostuneita alkioita (Tahir ym., 2006). *AGO*-geenit toimivat muita geenejä hilliten, sillä ne koodaavat proteiineja, jotka sitoutuvat muiden geenien RNA-tuotteisiin estäen niiden toiminnan soluissa.

SE on aina epigeneettinen reaktio riippumatta siitä, onko se käynnistynyt luonnossa ääriolosuhteiden vai *in vitro* -olosuhteissa hormonikäsittelyn vuoksi. Epigeneettiset mekanismit vaikuttavat geenien ilmentymiseen muokkaamalla DNA:n emäksiä tai muuttamalla DNA-juosteen pakautumista histonien tai kromatiinin rakenteen muutoksien. DNA:n sekvenssi eli emäsjärjestys pysyy kuitenkin aina ennallaan epigeneettisistä muutoksista huolimatta (Fehér, 2015). Yksi näistä mekanismeista on DNA:n metylaatio, jossa DNA-juosteen sytosiini-emäkseen liitetään metyyliiryhmä (Zheng ym., 2018). Se voi tapahtua joko geenin promoottorin tai sen koodaavalla alueella. Metylaation tapahtuminen geenin promoottorialueella estää geenin ilmentymisen joko suoraan vaikuttaen transkriptiotekijöiden sitoutumiseen juosteeseen tai epäsuoraan muokkaamalla histonia siten, että geenin ekspressio estyy. DNA:n metylaation on todettu olevan tärkeä mekanismi sekä tsygoottisen että somaattisen alkionkehityksen aikana (Bravo ym., 2017), koska se vaikuttaa muun muassa auksiinigradientin syntyyn soluissa (Fehér, 2015). Histonien metylaatio voi vaikuttaa joko heikentäen tai aktivoiden geenin ilmentymistä (Fehér, 2015) ja niiden asetylaatio taas yleensä estää geenin ilmentymisen (Zhang ym., 2018). Kromatiinin ja histonien välisiä sidoksia voidaan murtaa myös suoraan ATP:tä energianlähteenään käyttävien entsyymien avulla (Fehér, 2015). Kromatiinin rakenteen muutokset mahdollistavat hormonien erityksen ja polaarisuuden soluissa ja siten alkion kehittymisen (Bonga ym., 2010). Onkin todettu, että muutokset kromatiinin rakenteessa kontrolloivat kasvisolujen totipotentsuutta

(Méndez-Hernández ym., 2019). Esimerkiksi tietynlaiset kromatiinin rakenteen muutokset ovat välttämättömiä, jotta *WUS*-geeni voi ekspressoitua soluissa (Fehér, 2015).

Bravon ym. (2017) tutkimuksessa havaittiin, että embryogeneesiin kykenevissä solukoissa metyloitujen emästen osuus oli huomattavasti pienempi kuin embryogeneesiin kykenemättömissä. Kulloinkin metyloidut geenit kuitenkin vaihtelevat SE:n eri vaiheissa (Smertenko ja Bozhkov, 2014). Esimerkiksi *LEC1*-geenin säätelyalueen metylaatio vähenee SE:n käynnistysvaiheen aikana, mutta lisääntyy alkioden kypsyessä (Smertenko ja Bozhkov, 2014). Koska säätelyn ajoitus ja voimakkuus ovat kasvien alkionkehityksessä tärkeitä, voi esimerkiksi vääränlainen DNA:n metylaatio johtaa alkioden epämuodostumiseen (Zhang ym., 2018).

2.3 Erot somaattisessa alkionkehityksessä lajien ja genotyyppien välillä

SE:n onnistumisessa on havaittu eroavaisuuksia sekä havupuulajien että niiden sisäisten linjojen välillä. Eroja on SE:n kaikissa vaiheissa aloituksesta kypsytykseen (Egertsdotter, 2019). Park ym. (2016) tutkivat useiden eri mäntylajien, niiden sisäisten linjojen ja ulkoisten tekijöiden vaikutuksia SE:hen. Tutkimuksen alussa he olettivat, että linjojen väliset erot johtuvat siemenen eri kypsymisnopeuksista, jolloin poiminnan ajankohtana osa siemenistä voi olla liian nuoria tai vanhoja SE:n käynnistymisvaiheeseen. Linjojen välisillä geneettisillä eroavaisuuksilla oli kuitenkin ajankohtaa suurempi vaikutus SE:n onnistumiseen. Linjojen väliset geneettiset erot vaikuttivat alkionkehityksen lisäksi siihen, kuinka vahvasti ulkoiset tekijät, kuten kasvatusalustojen sisältämät aineet ja niiden konsentraatiot, vaikuttivat SE:hen. Erot ovat selkeämmin havaittavissa havupuulajien kuin yksittäisten linjojen välillä. Esimerkiksi kuuset alkavat tuottaa proembryogeenistä solukkoa mäntyjä helpommin, ja niiden PEM-solukoista erilaistuneet alkiot selviävät yleensä idätysvaiheeseen asti mäntyjä paremmin (Egertsdotter, 2019). Joidenkin kuusilinjojen PEM-solut pysyvät alkiontuottokykyisinä vain pari viikkoa, kun toiset taas tuottavat alkioita jopa vuosien ajan (Varis ym., 2014). Yleisesti ottaen mäntyjen PEM:t ovat kuusien solukoita lyhytikäisempiä, eikä niiden ole havaittu pysyvän alkiontuottokykyisinä yhdeksää kuukautta pidempään (Egertsdotter, 2019).

2.4 Kryopreservaatio ja sen hyödyntäminen somaattisen alkionkehityksen yhteydessä

Kasvimateriaalin kryopreservaatiolla tarkoitetaan solukoiden tai kasvinosien säilömistä äärimmäisen kylmässä lämpötilassa, yleensä nestetypessä $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Tällöin lähes kaikki solutoi-

minnot ovat pysähtyneet (Li ym., 2018), eli solut eivät ”ikäänny” ja niitä voidaan säilöä periaatteessa rajattoman pitkään. Menetelmää voidaan käyttää esimerkiksi geneettisesti muunnellun kasvimateriaalin säilömiseen tai uhanalaisten kasvilajien ja tärkeiden tuotantokasvien geenipankkien perustamiseen (Reed, 2008). Kasvikantoja voidaan ylläpitää myös perinteisillä viljelmillä, mutta ne vaativat runsaasti resursseja ja voivat tuhoutua esimerkiksi ympäristön muutosten vuoksi (Li ym., 2018). SE:tä hyödynnetessä toimivien kryopreservaatiomenetelmien kehittäminen on erityisen tärkeää, sillä PEM:ien käsittely alustoilla vie myös runsaasti aikaa (Varis ym., 2014). Lisäksi SE:n pidentyneen kasvuvaiheen pelätään lisäävän riskiä haitallisiin geneettisiin muutoksiin, vaikkei asiasta olekaan löytynyt kovin vahvoja todisteita (Egertsdotter, 2019). Kryopreservatio puolestaan on melko luotettava tapa solukoiden ja kasvinosien säilömiseen. Esimerkiksi vuonna 2013 tehdyssä tutkimuksessa metsämännyn (*Pinus sylvestris* L.) PEM-solukoista 80–93 % toipui kryopreservatian jälkeen, kun toipumista arvioitiin sulatetun solukon kasvukyvyn perusteella (Latutrie & Aronen, 2013). Kryopreservatian onnistumiseen vaikuttavat aloitusmateriaalin genotyyppi, solukon kehitysvaihe ja viljelmän ikä (Li ym. 2018). Myös solutiheys on merkittävä tekijä menetelmän onnistumisen kannalta, sillä vain solut, joilla on tiivis solulima ja pienet vakuolit, voivat selviytyä kryopreservatiosta (Kulus & Zalewska, 2014).

On olemassa lukuisia eri kryopreservatiotekniikoita, ja ne jaotellaan perinteisiin ja moderneihin menetelmiin. Käytettävä tekniikka valitaan säilöttävän kasvimateriaalin lajin ja tyyppin (erilaistunut vai erilaistumaton solukko) mukaan, sillä nämä tekijät vaikuttavat kasvin kykyyn sietää kuivumista ja kylmyyttä (Kulus & Zalewska, 2014). Perinteisillä menetelmillä tarkoitetaan asteittaista jäähdystystä (controlled rate cooling tai slow cooling) muunnoksineen. Asteittainen jäähdytys on ensimmäisenä kehitetty kryopreservatiotekniikka (Reed, 2008), joka soveltuu erilaistumattomalle ja myös erilaistuneelle solukolle, jos laji on sopeutunut voimakkaisiin lämpötilan vaihteluihin (Kulus & Zalewska, 2014). Menetelmässä kasvinäytteet jäähdytetään ensin haluttuun lämpötilaan ja siirretään vasta sen jälkeen nestetyppeen. Asteittainen jäähdytys on yksinkertainen ja tehokas tapa käsitellä suurta määrää näytteitä kerralla (Reed, 2008), Modernit vitrifikaatiomenetelmät (vitrification-based methods) sopivat heikosti kylmyyttä sietävien lajien erilaistuneille solukoille. Näytteet kuivatetaan PVS- (plant vitrification solution) tai sakka-roosiliuoksella (Kulus & Zalewska, 2014) ja siirretään sen jälkeen suoraan nestetyppeen ilman erillistä jäähdytysvaihetta. PVS:n käytön lisäksi tai sen sijasta näytteet voidaan säilöä kapselisiin kryopreservatian ajaksi. Kapselointimenetelmän on havaittu toimivan usein ainakin yhtä hyvin kuin muidenkin vitrifikaatiomenetelmien ja pitävän joissain tapauksissa myös kasvien

kanssa symbioosissa elävän sienirihmaston elossa. Kapselointimenetelmä vaatii kuitenkin paljon aikaa. Lisäksi kapselien sisällä olevat kalsiumhelmet voivat vaurioittaa näytettä ja lisätä epätoivotun kalluksen muodostumista näytteissä sulatuksen jälkeen.

Näytteiden kuivuuden ja kylmyyden sietokykyä voidaan parantaa esimerkiksi kylmäkaraisulla eli säilömällä näytteitä 0–4 °C:ssa muutamista päivistä viikkoihin ja/tai käsittelemällä näytteitä kryosuoja-aineilla ennen nestetyppeen siirtoa (Li ym., 2018). Kryosuoja-aineiden toiminta perustuu siihen, että ne kuivattavat solua, madaltavat sen jäätymispistettä ja nostavat sytosolin joustavuutta. Näin ne vähentävät jäätymisen ja veden kristalloitumisen aiheuttamia vaurioita soluille (Kulus & Zalewska, 2014). Kryopreservatioon voidaan yhdistää esiviljely alustalla, jossa on korkea sokeri- tai sokerialkoholipitoisuus (Li ym., 2018). Joidenkin kryosuoja-aineiden, kuten dimetyylisylfoksidin (DMSO), on arveltu lisäävän riskiä solujen geenimutaatioihin, kuten myös pitkäkestoisen kryopreservatoin. Kryopreservatoin tarkoituksena on kuitenkin taata näytteiden pitkäaikainen säilyvyys ja DMSO:n on havaittu olevan hyvin tehokas kryosuoja-aine esimerkiksi glukoosiin verrattuna (Kulus & Zalewska, 2014). Mutatoitumistodennäköisyydessä on myös vaihtelua eri näytetyyppien välillä: esimerkiksi kärki- ja horrossilmujen on havaittu olevan geneettisesti vakaampia kuin yksittäisten solujen tai PEM-solukon (Li ym., 2018). Tällä hetkellä havupuiden SE:hen vaaditaan PEM-solukkoa, eikä sitä ole toistaiseksi saatu onnistumaan riittävän hyvin kärkisilmuista tai muista erilaistuneista solukoista (Varis ym., 2014), joten mutatoitumisriskiä ei voida pienentää säilömällä PEM:ien sijasta muuta solukkoa. Kryosuoja-aineiden käyttö voidaan myös välttää kokonaan esimerkiksi säilöittäessä jo luonnostaan hyvin kuivia solukoita, kuten siemeniä ja itiöitä. Esialkiollista solumassaa ja muita runsaasti nestettä sisältäviä solukoita säilöittäessä kryosuoja-aineet ovat kuitenkin välttämättömiä (Kulus & Zalewska, 2014).

SE:n kautta tuotettujen PEM-solukoiden onnistunut kryopreservatio on niiden alkiontuottokyvyn nopean heikkenemisen vuoksi välttämätöntä, jotta SE voisi olla havupuilla käytännössä toimiva menetelmä. Ilman kryopreservatiota PEM:t ovat lyhyen aikaa hyödynnettäviä kerta-käyttötuotteita, jolloin menetetään mahdollisuus koeviljelyihin ja taimien kehitysvaiheen optimointiin vuodenaikojen ja ympäristöolosuhteiden suhteen. Tyypillisiä piirteitä havupuiden kryopreservatiolle ovat kuivattava esikäsitteily (joko kylmäkaraisulla ja/tai sakkarosilla/muilla kryosuoja-aineilla), DMSO:n käyttö kryosuoja-aineena ja nopea sulatus nestetypissäilytyksen jälkeen. Esimerkkinä voidaan tarkastella Häggmannin ja muiden (1998) käyttämää menetelmää metsämännyn PEM-solukoiden nestetypissäilytyksessä. Aluksi he kylmäkaraisivat solukot viiden celsiusasteen lämpötilassa 14 päivän ajan, minkä jälkeen ne käsiteltiin

kahteen kertaan sakkaroosilla ja sen jälkeen kryosuojaa-aineella. Verratessaan eri suoja-aineseosten vaikutusta solukoiden nestetyppisäilytyksen jälkeiseen kasvuun he totesivat parhaimmaksi seoksen, joka sisälsi 10 % polyetyleeniglykolia, 10 % glukoosia ja 10 % DSMO:ta. Suoja-aineilla käsittelyn jälkeen solukot jäähdytettiin nopeudella 10 C°/h -38 celsiusasteeseen, jonka jälkeen ne siirrettiin välittömästi nestetyyppeen. Kryopreservaaation jälkeen näytteiden sulatus tehtiin +37 celsiusasteen lämpöisessä vesihauteessa ja suoja-aineet valutettiin pois näytteistä ja näytteet huuhdeltiin DCR-liuoksella, joka on alun perin kuusen solukkoviljelyssä kasvatusalustana käytetty seos.

3. Soveltaminen käytäntöön

3.1 Somaattisen alkionkehityksen hyödyntäminen havupuilla

SE herättää suurta kiinnostusta pitkälti metsätalouden tarpeiden vuoksi. Puutavaran tarpeen arvellaan kasvavan jopa miljardilla kuutiometrillä vuoteen 2040 mennessä (Lelu-Walter ym., 2013). Tämä edellyttää metsätalouden tuotannon merkittävää kasvua, jolloin tarvitaan uusia menetelmiä metsänviljelyn tehostamiseksi.

Havupuut ovat metsätaloudelle tärkeitä ja perinteisiä puulajeja (Häggman ym., 2005), koska niitä käytetään raaka-aineina muun muassa paperituotteiden ja rakennusmateriaalien valmistuksessa. Havupuiden taimia voidaan toki tuottaa enemmän myös perinteisellä tavalla, eli kasvattamalla jokaisesta suvullisen lisääntymisen tuottamasta siemenestä yksi puu. Perinteisellä menetelmällä jokaisesta siemenestä kehittyy kuitenkin omanlaisensa, geneettisesti ainutlaatuinen puu, jonka ominaisuuksia ei kyetä etukäteen arvioimaan kovinkaan suurella tarkkuudella. Toinen riski on itsepölytteisten siementen syntyminen, sillä ne pärjäävät heikosti eikä niihin siten kannata haaskata resursseja (Lelu-Walter ym., 2013). Havupuilla on myös yleensä melko pitkät lisääntymiskierrot, minkä vuoksi niiden jalostus perinteisin menetelmin on hidasta (Häggman ym., 2005).

SE voisi tuoda merkittäviä hyötyjä puunjalostukseen, koska sen avulla voitaisiin tuottaa haluttu määrä taimia, joiden genotyyppi tunnetaan (Lelu-Walter ym., 2013). Koska SE:n avulla tuotettua PEM-solukkoa voidaan säilöä nestetyypessä jopa vuosien ajan, ei uusien taimien tuottamiseksi tarvitsisi odottaa aikuisten puiden seuraavaa lisääntymiskautta. Sen sijaan nestetyyppeen varastoitua solukkoa olisi mahdollista sulattaa ja kypsyttää taimiksi aina tarpeen vaatiessa. SE:n avulla olisi myös mahdollista saada muutoin steriilit hybridit lisääntymään, jolloin saataisiin

kuusia ja hyödyllisiä geeniyhdistelmiä. Esimerkiksi *Pinus glauca* x *Pinus engelmannii*-hybrideistä tuotettiin vuosina 1997–1998 yli 300 000 taimea SE-tekniikan avulla (Hazubska-Przybyl & Bojarczuk, 2016). SE voisi myös helpottaa geneettisesti muunnellun kasvimateriaalin käyttöä puunjalostuksessa, sillä PEM-solukon on havaittu olevan hyvä pohja siirtogeenisten kasvien tuottamiselle. Vierasperäinenkin geeni ilmenee siinä usein hyvin ja muunnellusta solukosta voidaan tuottaa suuri määrä siirtogeenisiä kasveja. Embryogeenistä massaa on onnistuneesti muokattu siirtogeenisiksi useilla *Picea*- ja *Pinus*-sukujen lajeilla (Hazubska-Przybyl & Bojarczuk, 2016). Toistaiseksi SE:n kaupallinen hyödyntäminen on kuitenkin ollut vielä melko vähäistä, sillä Euroopassa havupuiden SE on lähinnä tutkimuksessa hyödynnetty menetelmä ja Euroopan ulkopuolisissa maissa, kuten Yhdysvalloissa, Kanadassa ja Uudessa-Seelannissa, vain muutamat yritykset ovat tuottaneet havupuiden SE-taimia myyntiin tai omaan käyttöönsä (Lelu-Walter ym., 2013).

Vaikkei SE mullistaisikaan paperi- tai rakennuspuun tuotantoa, ainakin se tarjoaisi mahdollisuuksia joulukuusten ja muiden koristepuiden jalostajille (Varis ym., 2014). Kaikki saman linjan solukoista syntyvät yksilöt ovat toistensa klooneja, joten samoissa ympäristöolosuhteissa niistä kehittyy keskenään erittäin saman näköisiä. Solukkolisäystä käytetään jo nyt Saksassa joulupuiksi kasvatettavien kaukaasianpihtojen (*Abies nordmanniana*) lisäykseen (Varis ym., 2014). Joulupuiden tapauksessa tuotettujen taimien melko korkea hinta ei ole este menetelmän käytölle, sillä hyvälaatuisen joulupuun myyntihinta on niin korkea, että se riittää kattamaan runsaasti käsityötä vaativan menetelmän kustannukset (Lelu-Walter ym., 2013).

SE:n kehittäminen havupuilla hyödyntäisi myös tutkimusta. Koska hyvin toimiva SE mahdollistaisi hyvin suuren kloonimäärän tuottamisen, sen avulla voitaisiin tutkia esimerkiksi perimän ja ympäristön (GxE-suhteen) välistä vuorovaikutussuhdetta (Lelu-Walter ym., 2013). Tällöin lukuisia saman perimän omaavia taimia voitaisiin istuttaa erilaisiin ympäristöihin ja nähdä laajasti, kuinka ympäristö vaikuttaa puiden fenotyypeihin. SE:tä voitaisiin hyödyntää myös puiden alkioden kehityksen ja solujen erilaistumisen tutkimuksessa (Filonova ym., 2000). Menetelmän avulla olisi mahdollista tutkia havupuiden alkionkehityksen niitä vaiheita, joita suvullisesti syntyneistä alkioista ei tällä hetkellä kyetä näkemään, koska vastahedelmöittyneitä tsygoottisia alkioita on vaikea eristää emokasvista.

SE:n kehittyminen hyödyntäisi myös luonnonsuojelua. Jos puuviljelmiä voitaisiin käyttää aiempaa tehokkaammin metsäteollisuuden tarkoituksiin, ei luonnonmetsiin kohdistuisi enää yhtä suuria hakkuupaineita kuin muutoin. Tällöin luonnonmetsien voitaisiin antaa kehittyä entistä monimuotoisemmiksi eikä niiden pinta-ala kutistuisi puuntarpeen kasvaessa (Sedjo, 2004).

SE voisi mahdollistaa myös metsäpinta-alan ylläpitämisen kehittyvissä maissa, joissa luonnonmetsää kaadetaan tarvekäyttöön (Häggman ym., 2005).

3.2 Ongelmat & riskit

SE ei ole ongelmaton menetelmä, vaan sen käyttöä vaikeuttavat biologiset, taloudelliset ja sosiaaliset seikat. Biologisilla ongelmilla tarkoitetaan sekä itse menetelmän heikkouksia että sen avulla tuotettujen puiden käyttämisessä ilmeneviä haasteita, kuten mahdollisuutta geneettisen monimuotoisuuden vähenemiseen. Taloudelliset ongelmat johtuvat siitä, että SE on tällä hetkellä melko kallis menetelmä eikä sen käyttöön metsätaloudessa ole tämän takia ollut juurikaan halukkuutta. Sosiaaliset ongelmat puolestaan liittyvät menetelmään kohdistuviin asenteisiin ja ennakkoluuloihin. Pelkoa herättää myös ajatus siitä, mitä tapahtuu, jos ihminen muokkaa ympäröivää luontoa ymmärtämättä tekojensa seurauksia pitkällä aikavälillä.

3.2.1 Biologiset ongelmat

Somaattisen embryogeneesin käyttökelpoisuutta heikentää muun muassa se, että menetelmän avulla tuotetut taimet eivät aina selviydy kasvatusalustojen ulkopuolisessa ympäristössä. Häggmanin ym. (2005) mukaan yksi syy tähän on se, että SE-kasveilla on yleensä heikommat juuret kuin tsygoottisesti syntyneillä verrokeillaan. SE-mäntyjen juurten kehitystä voidaan kuitenkin parantaa kasvattamalla itäneitä alkioita samanlaisten sienirihmaston kanssa, kuin mitä luonnossa elävillä männyillä on juurissaan. Tämä on ymmärrettävää, sillä luonnossa näiden itiörihmastojen tehtävänä lajienvälisessä mutualistisessa suhteessa on parantaa puun ravinteiden ja veden ottoa maaperästä (Häggman ym., 2005).

SE:n epäillään lisäävän somaklonaalisten muutosten määrää soluissa ja sen on havaittu aiheuttavan havupuilla vähäisiä mutaatioita mitokondriaaliseen DNA:han. Tämän vuoksi kasvuvaiheen ei suositella kestävän yhdeksää kuukautta pidempään. Pidennetyn kasvuvaiheen ei kuitenkaan olla havaittu lisäävän mutaatioita eikä vaikuttavan muutenkaan negatiivisesti aikuisten puiden fenotyyppiin (Egertsdotter, 2019).

SE:tä hyödynnettäessä on myös riskinä lajin geneettisen muuntelun vähentyminen (Lelu-Walter ym., 2013). Tiedyt genotyypit sopeutuvat SE:hen muita paremmin, minkä vuoksi huonommin menetelmään sopivat linjat voivat jäädä syrjään jalostuksessa. Tällöin näiden linjojen positiiviset ominaisuudet voivat kadota. Toisaalta SE:n erinomaisuus metsätalouden kannalta perustuu juuri siihen, että se tuottaa mahdollisimman samankaltaisia puuyksilöitä eli puiden vä-

lillä on vähän geneettistä muuntelua. Luonnossa esiintyy myös ilman ihmisen vaikutusta syntyneitä metsiä, joissa kaikki puut ovat syntyneet suvuttomalla lisääntymisellä ollen näin toisensa kloonveja. Ainakin periaatteessa kasvullisen lisäyksen menetelmillä voitaisiin kasvattaa metsä, jonka monimuotoisuus olisi jopa luonnonmetsää suurempi. Geneettisen monimuotoisuuden ylläpito kuitenkin lisää taloudellisia haasteita, ainakin silloin, jos monimuotoisuutta ylläpidetään tuotantokapasiteetin kustannuksella (Lelu-Walter ym., 2013).

3.2.2 Sosiaaliset ja taloudelliset ongelmat

Eliöiden geneettinen muuntelu herättää runsaasti epäluuloja, eikä SE-metsien kasvatus jää niistä paitsi (Lelu-Walter ym., 2013). Geenimuunneltujen tai geneettisesti paranneltujen puiden pelätään leviävän puuviljelmien ulkopuolelle ja vievän tilaa luonnonmetsiltä tai että muunneltujen puiden geenit leviäisivät luonnonpuihin (Sedjo, 2004). Riittämätön tiedotus SE:stä ja muista kasvintuotantomenetelmistä voi vaikuttaa negatiivisesti yleiseen mielipiteeseen ja siten lisätä rajoitteita näiden menetelmien käytölle. Myös metsänomistajien ennakkoluulot hidastavat kasvullisen lisäyksen menetelmien yleistymistä metsätaloudessa (Lelu-Walter ym., 2013). Kuitenkin SE:n laajempaa käyttöönottoa hidastavat ennakkoluulojen sijaan ennemminkin sen aiheuttamat korkeat kulut (Lelu-Walter ym., 2013), minkä vuoksi SE:n käyttö on ainakin tällä hetkellä kannattamatonta metsätalousyrityksille.

SE-puiden ei kuitenkaan olla havaittu menestyvän tsygoottisesti syntyneitä verrokkejaan huomomin taimivaiheesta eteenpäin (Egertsdotter, 2019), joten jos SE:tä itsessään tehostettaisiin, eivät sen aiheuttamat kustannukset olisi välttämättä ylitsepääsemättömän suuria. SE:n korkeat kustannukset johtuvat enimmäkseen siitä, että solukot tulee siirrostaa käsin uusille, kiinteille kasvatusalustoille, mikä vie runsaasti aikaa. Solukoiden kasvatus nestemäisissä liuoksissa voisi mahdollistaa menetelmän automatisoinnin ja edistää siten menetelmän kaupallista hyödyntämistä (Egertsdotter ym., 2019). Nestemäisissä kasvatusliuoksissa solukoiden ravinteiden saanti helpottuisi ja ravinteiden ja hormonien lisääminen voitaisiin koneellistaa täysin. SE:n vaiheista helpoin toteuttaa bioreaktoreissa olisi todennäköisesti solukoiden monistusvaihe, sillä solukoiden on havaittu toisinaan menestyvän nestemäisillä alustoilla jopa paremmin kuin kiinteillä. Sen sijaan esimerkiksi aloitusvaiheen automatisointi olisi vaikeampaa, sillä siementen ulkomuoto vaihtelee suuresti ja niiden sisällä olevat alkiot vaativat varovaista käsittelyä. Myös alkioiden kypsytyks nestemäisissä kasvatusliuoksissa on ollut suurimmalla osalla havupuulajeista tähän mennessä haastavaa. Toisaalta levittämällä kypsyttämättömiä alkiota laajemmalle alueelle

ja muuttamalla alustojen koostumusta voitaisiin alkioden kypsymistä muuttaa samanaikaisemmaksi nykyiseen verrattuna, mikä tehostaisi kypsytysvaihetta myös kiinteillä alustoilla (Egertsdotter ym., 2019).

SE:tä voitaisiin tehostaa myös erottelemalla tarkemmin hyvälaatuiset PEM-solut ja alkiot huonolaatuisista, esimerkiksi hyödyntämällä tietokoneohjelmia laadukkaiden alkioden tunnistuksessa (Lelu-Walter ym., 2013). Samoin voitaisiin myös pyrkiä tunnistamaan paremmin kohdassa 2.2 mainittuja muutoksia PEM-solukoiden epigenetiikassa ja geenien toiminnassa (Bravo ym., 2017), jolloin SE:hen sopimattomat solut voitaisiin hylätä mahdollisimman varhaisessa vaiheessa prosessia. Useilla mäntyjen suvun lajeilla on havaittu myös vahvat maternaalisen linjan vaikutukset SE:hen, joten menetelmään sopivien puiden valitsemisessa voisi olla järkevää painottaa emopuun ominaisuuksia (Park ym., 2006).

4. Yhteenveto

SE on stressin käynnistämä epigeneettinen reaktio ja esimerkki luonnossa esiintyvistä mekanismeista, jota ihminen voi käyttää hyväkseen tuottaakseen ja jalostaakseen kasveja. Havupuiden SE tarjoaa mahdollisuuksia niin metsätaloudelle, luonnonsuojelulle kuin tutkimukselle. Se voi auttaa lisäämään niin luonnon monimuotoisuutta kuin ihmisten taloudellista hyvinvointia. Näiden hyötyjen vuoksi on perusteltua käyttää resursseja menetelmän kehittämiseen havupuilla, vaikka SE on monella muulla lajilla helpompi toteuttaa ja mahdollista jopa suoraan aikuisista yksilöistä ilman kypsymättömän siemenen käyttöä aloitusmateriaalina.

Kun pohditaan SE:n käyttökelpoisuutta ja turvallisuutta, joudutaan tarkastelemaan niin menetelmään liittyviä eettisiä näkökantoja, metsäpuiden taloudellista merkitystä kuin genetiikan, epigenetiikan ja kasvihormonien välistä monimutkaista verkostoa. Tämä osoittaa myös sen, että SE:n kehittäminen vaatii lukuisten eri alojen asiantuntijoiden yhteistyötä, aina insinööreistä biotieteiden tutkijoiden kautta taloustieteilijöihin. Vain täten voidaan kehittää ymmärrystä niin SE:hen vaikuttavista perinnöllisistä tekijöistä kuin menetelmän automatisoinnista sekä menetelmän taloudellisesta kannattavuudesta.

Vaikka geeni- ja biotekniikan menetelmiä kohtaan tunnetaan usein suuria ennakkoluuloja, voidaan nykyisen ympäristökriisin edessä pohtia, onko meillä mitään muita vaihtoehtoja, jos haamme mahdollistaa tulevien sukupolvien hyvinvoinnin ja selviämisen maapallolla ja säilyttää taloudelliset ja sosiaaliset järjestelmät nykyisen kaltaisina. Tulee myös muistaa, että nykyinen tilanne on saatu aikaan perinteisillä ja täysin ”luonnollisilla” menetelmillä. Ilmeisesti ihmisellä

on taipumus ylittää itsensä ja ympäristönsä rajat, mikä onnistuu monin eri tavoin, joko geoniteknikan avulla tai ilman sitä. Toki SE:n kaltaisen uuden menetelmän laajempi käyttö edellyttäisi varovaisuutta, jotta menetelmän käyttö olisi aidosti kestävä kehityksen periaatteiden mukaista. Etenkin menetelmää mahdollisesti hyödyntävien yritysten toimintaa olisi säädeltävä tarkoin, jotta esimerkiksi luonnon monimuotoisuus ei kärsisi taloudellisen voiton tavoittelun vuoksi. SE:n yleistyminen voisi tuoda mukanaan myös uusia lainsäädäntöön liittyviä ongelmia. Saako toisen omistaman puun kloonata ilman lupaa? Myös SE:n ja kryopreservaaation mahdollisesti indusoimia geneettisten mutaatioiden riskiä sekä SE-puiden vaikutuksia metsäekosysteemeihin olisi tutkittava.

SE tarjoaa kuitenkin suurenmoisia mahdollisuuksia ja itse odotan mielenkiinnolla, mitä tulevaisuus tuo tullessaan. On kiinnostavaa nähdä, jääkö SE pelkästään rajatun tutkijajoukon ja koristekasvien jalostajien työkaluksi vai yleistyykö se laajemmalle esimerkiksi kehittämään hyötykasvien jalostusta. Nähtäväksi jää myös, onnistutaanko menetelmää koskaan kehittämään niin, että se saataisiin toimimaan aikuisten havupuiden osista. Tämä voisi entisestään nopeuttaa ja helpottaa puunjalostusta, koska tällöin koeviljelmät eivät olisi enää välttämättömiä.

5. Läheteet

- Bonga, J., Klimaszewska, K., Klimaszewska, K., von Aderkas, P., & von Aderkas, P. (2010). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100(3), 241-254. doi:10.1007/s11240-009-9647-2
- Bravo, S., Bertín, A., Turner, A., Sepúlveda, F., Jopia, P., Parra, M. J., Castillo, R. & Hasbún, R. (2017). Differences in DNA methylation, DNA structure and embryogenesis-related gene expression between embryogenic and non embryogenic lines of *Pinus radiata* D. don. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 130(3), 521-529. doi:10.1007/s11240-017-1242-3
- Egertsdotter, U. (2019). Plant physiological and genetical aspects of the somatic embryogenesis process in conifers. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 34(5), 360-369. doi:10.1080/02827581.2018.1441433
- Egertsdotter, U., Ahmad, I., & Clapham, D. (2019). Automation and scale up of somatic embryogenesis for commercial plant production, with emphasis on conifers. *Frontiers in Plant Science*, 10, 109. doi:10.3389/fpls.2019.00109
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1849(4), 385-402. doi:10.1016/j.bbagr.2014.07.005
- Filonova, L. H., Bozhkov, P. V., & Von Arnold, S. (2000). Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany*, 51(343), 249-264. doi:10.1093/jexbot/51.343.249
- Häggman, H., Vuosku, J., Sarjala, T., Jokela, A., & Niemi, K. (2005). Somatic embryogenesis of pine species: from functional genomics to plantation forestry. *Plant Cell Monographs* 2, 119-140. doi:10.1007/7089_032
- Häggman, H., Ryyänänen, L., Aronen, T., & Krajnakova, J. (1998). Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54(1), 45-53. doi:10.1023/A:1006104325426
- Hazubska-Przybyl, T., & Bojarczuk, K. (2016). Tree somatic embryogenesis in science and forestry. *Dendrobiology*, 76, 105-116. doi:10.12657/denbio.076.010
- Kulus, D., & Zalewska, M. (2014). Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species - a review. *Scientia Horticulturae*, 168, 88-107. doi:10.1016/j.scienta.2014.01.014
- Latutrie, M., & Aronen, T. (2013). Long-term cryopreservation of embryogenic *Pinus sylvestris* cultures. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 28(2), 103-109. doi:10.1080/02827581.2012.701325
- Lelu-Walter, M. -A., Thompson, D., Harvengt, L., Sanchez, L., Toribio, M., & Pâques, L. E. (2013). Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genetics and Genomes*, 9(4), 883-899. doi:10.1007/s11295-013-0620-1

- Li, J. -W., Ozudogru, E. A., Li, J., Wang, M. -R., Bi, W. -L., Lambardi, M., & Wang, Q. -C. (2018). Cryobiotechnology of forest trees: recent advances and future prospects. *Biodiversity and Conservation*, 27(4), 795-814. doi:10.1007/s10531-017-1481-y
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-la-Peña, C. Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 10, 77. doi:10.3389/fpls.2019.00077
- Park, Y. S., Lelu-Walter, M. -A., Harvengt, L., Trontin, J. F., MacEacheron, I., Klimaszewska, K., & Bonga, J. M. (2006). Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(1), 87-101. doi:10.1007/s11240-006-9101-7
- Roger A. Sedjo. (2004). Genetically engineered trees: promise and concerns. *Resources for the Future*, <https://www.rff.org/publications/reports/genetically-engineered-trees-promise-and-concerns/>. Viitattu 19.11.2019.
- Saila Varis, & Susanne Heiska ja Tuija Aronen. (2014). Kuusen solukkolisäys. Metlan työraportteja. <http://www.metla.fi/julkaisut/workingpapers/2014/mwp310.htm>. Viitattu 1.9.2019.
- Smertenko, A., & Bozhkov, P. V. (2014). Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1343-1360. doi:10.1093/jxb/eru005
- Tahir, M., Law, D. A., & Stasolla, C. (2006). Molecular characterization of PgAGO, a novel conifer gene of the ARGONAUTE family expressed in apical cells and required for somatic embryo development in spruce. *Tree Physiology*, 26(10), 1257-1270. doi:10.1093/treephys/26.10.1257
- Zhang, H., Lang, Z., & Zhu, J. -K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(8), 489-506. doi:10.1038/s41580-018-0016-z